

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-325160

(43)Date of publication of application : 10.12.1996

(51)Int.Cl.

A61K 38/22
A61K 9/107
A61K 47/30

(21)Application number : 07-152671

(71)Applicant : KAKEN PHARMACEUT CO LTD

(22)Date of filing : 26.05.1995

(72)Inventor : IKADA YOSHITO
TABATA YASUHIKO
HIJIKATA SHIGEKI**(54) POLYANION-ADDITION CROSSLINKED GELATIN PREPARATION CONTAINING
BASOPHILIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR****(57)Abstract:**

PURPOSE: To obtain a preparation having long sustained releasability, excellent in biocompatibility and low in stimulation by adding a small amount of a polyanion to a crosslinked gelatin gel and compounding the treated gelatin gel with a basophilic fibroblast growth factor (bFGF).

CONSTITUTION: This is a polyanion-addition crosslinked gelatin gel preparation prepared by compounding a polyanion-added crosslinked gelatin gel with bFGF. A crosslinking agent for the polyanion-addition crosslinked gelatin is preferably glutaraldehyde or a water-soluble carbodiimide [preferably, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride]. Further, the polyanion to be added is preferably carboxymethylcellulose, polyglutamic acid or dextran sulfate. Preferably, the gelatin gel is composed of 1-100w/v% of gelatin, 0.01-100w/v% of a crosslinking agent and 0.01-20w/v% of a polyanion, and its water content is 50-99w/v%.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 21.05.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-325160

(43) 公開日 平成8年(1996)12月10日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 38/22	A E D		A 6 1 K 37/24	A E D
9/107			9/107	E
47/30			47/30	C

審査請求 未請求 請求項の数12 F D (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願平7-152671	(71) 出願人	000124269 科研製薬株式会社 東京都文京区本駒込2丁目28番8号
(22) 出願日	平成7年(1995)5月26日	(72) 発明者	筏 義人 京都府宇治市五ヶ庄広岡谷2-182
		(72) 発明者	田畑 泰彦 京都府宇治市琵琶台3-8-16
		(72) 発明者	土方 重樹 静岡県藤枝市源助301番地 科研製薬株式 会社中央研究所内

(54) 【発明の名称】 塩基性繊維芽細胞増殖因子含有ポリアニオン付加架橋ゼラチンゲル製剤

(57) 【要約】

【目的】 本発明は、架橋ゼラチンゲルにポリアニオンを少量付加することにより、塩基性繊維芽細胞増殖因子の放出を抑制し、より長期にわたる塩基性繊維芽細胞増殖因子の徐放化を達成することができるポリアニオン付加架橋ゼラチンゲル製剤を提供する。

【構成】 ポリアニオン付加架橋ゼラチンゲルに、塩基性繊維芽細胞増殖因子を含ませてなることを特徴とするポリアニオン付加架橋ゼラチンゲル製剤。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ポリアニオン付加架橋ゼラチンゲルに、塩基性繊維芽細胞増殖因子を含ませてなることを特徴とするポリアニオン付加架橋ゼラチンゲル製剤。

【請求項2】 塩基性繊維芽細胞増殖因子が、下記の配列番号1および/または2で示されるアミノ酸配列を有するものである請求項1に記載のポリアニオン付加架橋ゼラチンゲル製剤。

【請求項3】 ポリアニオン付加架橋ゼラチンの架橋剤が、グルタルアルデヒドまたは水溶性カルボジイミドである請求項1に記載のポリアニオン付加架橋ゼラチンゲル製剤。

【請求項4】 水溶性カルボジイミドが、1-エチルー3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミドメト-p-トルエンスルホナートからなる群より選ばれる請求項3に記載のポリアニオン付加架橋ゼラチンゲル製剤。

【請求項5】 ポリアニオン付加架橋ゼラチンの架橋剤がグルタルアルデヒドまたは1-エチルー3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩である請求項3に記載のポリアニオン付加架橋ゼラチンゲル製剤。

【請求項6】 付加するポリアニオンが、ポリカルボン酸、ポリ硫酸、ポリリン酸からなる群より選ばれる1つまたは複数のポリアニオンである請求項1に記載のポリアニオン付加架橋ゼラチンゲル製剤。

【請求項7】 付加するポリアニオンが、カルボキシメチルセルロース、ポリグルタミン酸またはデキストラン硫酸である請求項6に記載のポリアニオン付加架橋ゼラチンゲル製剤。

【請求項8】 ポリアニオン付加架橋ゼラチンゲルが、ゼラチンの濃度1~100w/v%、架橋剤濃度0.01~100w/v%およびポリアニオン濃度0.01~20w/v%からなる請求項1に記載のポリアニオン付加架橋ゼラチンゲル製剤。

【請求項9】 ポリアニオン付加架橋ゼラチンゲルの含水率が50~99%である請求項1に記載のポリアニオン付加架橋ゼラチンゲル製剤。

【請求項10】 ポリアニオン付加架橋ゼラチンゲルの形状が、円柱状、角柱状、シート状、ディスク状、球状、粒子状、または不定形である請求項1に記載のポリアニオン付加架橋ゼラチンゲル製剤。

【請求項11】 塩基性繊維芽細胞増殖因子の水溶液をゲルに接触させ含浸させるか、または塩基性繊維芽細胞増殖因子の水溶液中にゲルを懸濁させることにより塩基性繊維芽細胞増殖因子をゲルに含有させることを特徴とする請求項1に記載のポリアニオン付加架橋ゼラチンゲル製剤。

【請求項12】 請求項1に記載の塩基性繊維芽細胞増殖因子含有ポリアニオン付加架橋ゼラチンゲル製剤を乾燥

させたことを特徴とする乾燥ポリアニオン付加架橋ゼラチンゲル製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、塩基性繊維芽細胞増殖因子(Basic Fibroblast Growth Factor、以下bFGFと略称する)を含有することを特徴とする、ポリアニオン付加架橋ゼラチンゲル製剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 bFGFは1974年にGospodarowicsによって、ウシ脳下垂体から繊維芽細胞の増殖を強く刺激するタンパク質として見いだされた(Nature; 24巻、124頁、1974年)。その後bFGFをコードする遺伝子がクローニングされ、遺伝子組み替え技術を用いた大量生産が可能になり、bFGFの研究は精力的に行われるようになった。その結果、繊維芽細胞ばかりでなく、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、角膜内皮細胞、骨芽細胞、軟骨細胞などの他種類の細胞に対する細胞増殖を刺激することが明らかになってきた。

【0003】 しかし、bFGFは、他のポリペプチドおよびタンパク質と同様に生体内半減期が短く、水溶液として投与したのでは期待する効果が得られない。そのため、bFGFを安定に保ち、ある一定の期間徐々に放出することのできる徐放化製剤とすることが望ましい。そこで本発明者らは、bFGFの徐放化製剤化を目的として、bFGFの徐放化担体について鋭意検討を重ねた結果、架橋ゼラチンゲルにbFGFを含浸させることによりなる製剤を発明した。このbFGF架橋ゼラチンゲル製剤は、マウス皮下血管新生やラット腓骨骨折治癒に対して有効であった(国際公開番号WO94/27630)。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 bFGFは、中性水溶液中では正に帯電している。この場合、同じ正電荷をもつ等電点9付近のゼラチンとは電気的に相互作用をしない。また、等電点5付近のゼラチンとは電気的に相互作用をするものの強いものとはいえない。本発明では、bFGFとマトリックスとの電気的な相互作用を強化することにより、bFGFのゲルマトリックスからの放出をさらに長期化するために、架橋ゼラチンゲル調製時に少量のポリアニオンを添加した。このようにして得られたゲルマトリックスが、bFGFの徐放化に適していることを見だし、本発明を完成させた。

【0005】

【課題を解決するための手段】 すなわち、本発明は、塩基性繊維芽細胞増殖因子を含浸させることを特徴とするポリアニオン付加架橋ゼラチンゲル製剤を要旨とする。本発明は、生体適合性が良く、刺激性の少ない架橋ゼラチンゲルにポリアニオンを付加することにより、より長期の徐放作用をもつbFGFの徐放性製剤を提供するこ

とに特徴を有する。徐放速度は、ポリアニオンの種類、ポリアニオンの添加濃度、ゲルの架橋度、架橋ゲルの含水率、用いるゼラチンの性質（等電点、分子量等）により変化させることが可能である。

【0006】以下、本発明を詳細に説明する。本発明のポリアニオン付加架橋ゼラチンゲル製剤は、徐放性担体であるポリアニオン付加架橋ゼラチンゲルに有効成分bFGFを含有してなるものである。本発明で用いる架橋ゼラチンゲルの原料となるゼラチンには、特に制限はなく、通常入手できるものでよい。このようなゼラチンとしては、例えば、等電点4.9アルカリ処理ゼラチン（新田ゼラチン社製）、等電点9.0酸処理ゼラチン（新田ゼラチン社製）等が挙げられる。また、ゼラチンは一種類のみでなく、溶解性、分子量、等電点および原料等の物性の異なるものを混合して用いてもよい。

【0007】本発明で用いることのできるポリアニオンとしては、生体高分子、合成高分子のいずれでもよく、例えばポリカルボン酸としては、カルボキシメチルセルロース、ポリグルタミン酸などのアニオン性ポリアミノ酸、カルボキシメチルスターチ、ヒアルロン酸、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸等が、ポリ硫酸としては、デキストラン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸、デルマタン硫酸、ポリビニル硫酸カリウム等が、ポリリン酸としてDNA、RNAなどの核酸、フォスマー等が好ましく、カルボキシメチルセルロース、ポリグルタミン酸およびデキストラン硫酸が特に好ましい。また、これらのポリアニオンは必要に応じて種類の異なるものを混合して用いることもできる。

【0008】本発明で用いることのできるゼラチンを架橋するための架橋剤としては、生体に対して毒性のないものであればよいが、例えばグルタルアルデヒド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、1-シクロヘキシル-3-(2-モリホリノエチル)カルボジイミドメト-p-トルエンシルホナート等の水溶性カルボジイミド、ビスエポキシ化合物、ホルマリン等が好ましく、グルタルアルデヒドおよび1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩が特に好ましい。

【0009】また、ゼラチンは、熱処理または紫外線照射によっても架橋化できる。本発明で用いる徐放性担体であるポリアニオン付加架橋ゼラチンゲルの形状は特に制限はないが、例えば円柱状、角柱状、シート状、ディスク状、球状、粒子状、不定形などがある。円柱状、角柱状、シート状、ディスク状のものについては、通常インプラントとして用いられることが多く、また、球状、粒子状、不定形ものは注射投与も可能である。円柱状、角柱状、シート状、ディスク状のポリアニオン付加架橋ゼラチンゲルは、ゼラチンとポリアニオンを混合した水溶液に架橋剤水溶液を添加するか、架橋剤水溶液に

ゼラチンとポリアニオンを添加し、所望の形状の鑄型に流し込み、架橋反応させて調整することができる。また、成形したゼラチンゲルとポリアニオンをそのまま、あるいは乾燥後に架橋剤水溶液を添加してもよい。架橋反応を停止させるには、エタノールアミン、グリシン等のアミノ基を持つ低分子物質に接触させるか、またはpH2.5以下の水溶液を添加する。得られたポリアニオン付加架橋ゼラチンゲルは、水溶液、エタノール、2-プロパノール（以下IPAという）、アセトン等により洗浄し、製剤調製に供される。

【0010】得られるポリアニオン付加架橋ゼラチンゲルの含水率は50~99w/w%（以下、単に%で表示する）である。ここでゲルの含水率とは、湿潤時のゲル全重量に対するゲル中の水分重量の割合を示す。球状、粒子状のポリアニオン付加架橋ゼラチンゲルは、例えば、三つ口丸底フラスコに固定した攪拌用モーター（例えば新東科学社製、スリーワンモーター、EYELA mini D. C. Stirrer等）とテフロン製攪拌用プロペラを取り付け、フラスコと一緒に固定した装置に、オリブ油等の油を入れ、ここにゼラチンとポリアニオンの混合水溶液を加えて200~600rpm程度の速度で攪拌し、W/O型エマルジョンとし、これに架橋剤水溶液を添加するか、ゼラチンとポリアニオンの混合水溶液をあらかじめオリブ油中にて前乳化（例えばvortex mixer Advantec TME-21、ホモジナイザーporytron PT10-35等）しておいたものをオリブ油中に滴下し、微粒子化したW/O型エマルジョンを調製し、これに架橋剤水溶液を添加し、架橋反応させ、遠心分離によりポリアニオン付加架橋ゼラチンゲルを回収し、アセトン、酢酸エチル等で洗浄し、さらにIPA、エタノール等に浸漬して架橋反応を停止させることにより調製することができる。得られたポリアニオン付加架橋ゼラチンゲル粒子は、IPA、Tween 80を含む蒸留水、蒸留水等で順次洗浄し、製剤調製に供される。

【0011】ポリアニオン付加架橋ゼラチンゲル粒子が凝集する場合には、例えば、超音波照射（冷却下、1分以内程度が好ましい）等を行ってもよい。なお、前乳化することによって、粒子サイズ20μm以下の微粒子状のポリアニオン付加架橋ゼラチンゲルが得られる。得られる架橋ゼラチンゲル粒子の平均粒径は、1~1000μmであり、目的に応じて適宜必要なサイズの粒子をふるい分けして使用する。また、得られるポリアニオン付加架橋ゼラチンゲル粒子の含水率は50~93%程度であり、適宜好ましい含水率のものを調製できる。球状、粒子状のポリアニオン付加架橋ゼラチンゲルを調製する別法として次のような方法もある。上記の方法と同様の装置にオリブ油を入れ、200~600rpm程度の速度で攪拌し、ここにゼラチンとポリアニオンを混合した水溶液を滴下し、W/O型エマルジョンを調製し、これ

を冷却後、アセトン、酢酸エチル等を加えて攪拌し、遠心分離によりポリアニオンを付加したゼラチン粒子を回収する。回収したポリアニオンを付加したゼラチン粒子をさらにアセトン、酢酸エチル等、次いでIPA、エタノール等で洗浄後乾燥させる。乾燥したポリアニオンを付加したゼラチン粒子を0.1% Tween 80を含む架橋剤水溶液に懸濁させ、緩やかに攪拌しながら架橋反応させ、使用した架橋剤に応じて0.1% Tween 80を含む100mM グリシン水溶液または0.1% Tween 80を含む0.004N HClなどにて

【0012】上記のようにして得られたポリアニオン付加架橋ゼラチンゲルは、減圧乾燥または凍結乾燥させることもできる。凍結乾燥は、例えばポリアニオン付加架橋ゼラチンゲルを蒸留水に入れ、液体窒素中で30分以上、または-80℃で1時間以上凍結させた後に凍結乾燥機で1～3日間乾燥させることにより行う。ポリアニオン付加架橋ゼラチンゲルを調製する際のゼラチン、ポリアニオン、および架橋剤の濃度は所望の含水率により適宜選択すべきであるが、ゼラチン濃度1～100w/v% (以下、単に%で示す)、ポリアニオン濃度0.01～20w/v% (以下、単に%で示す)、架橋剤濃度0.01～100w/v% (以下、単に%で示す) (1～5400mMに相当) が好ましい。ポリアニオン付加架橋ゼラチンゲルは、原料であるゼラチンおよび架橋剤の濃度を变化させることにより所望の含水率とすることができる。含水率を高くするには、ゼラチン濃度、架橋剤濃度共に低くし、逆に含水率を低くするには、ゼラチン濃度、架橋剤濃度共に高くすればよい。上記のようにして調製したポリアニオン付加架橋ゼラチンゲルにbFGFを含有させるためには、bFGF水溶液をポリアニオン付加架橋ゼラチンゲルに滴下して含浸させるか、ポリアニオン付加架橋ゼラチンゲルをbFGF水溶液中に懸濁して再膨潤させる。

【0013】ポリアニオン付加架橋ゼラチンゲルに含有させることができるbFGFの量は、ポリアニオン付加架橋ゼラチンゲルの含水率等により異なるが、ポリアニオン付加架橋ゼラチンゲル1mg当たり0.01～2000μgが可能である。なお、徐放期間、bFGFの放出量等は、製剤に含有されるbFGFの量、ポリアニオン付加架橋ゼラチンゲルの含水率、用いたゼラチンの等電点等の物性、用いたポリアニオンの分子量およびアニオンの置換度、投与される部位などの種々の条件により異なる。上記のようにして得られたbFGF含有するポ

リアニオン付加架橋ゼラチンゲル製剤 (以下、架橋ゼラチンゲル製剤という) は、凍結乾燥することもできる。凍結乾燥する場合には、例えば、液体窒素中で30分以上以上または-80℃で1時間以上凍結させた後に、凍結乾燥機で1～3日間乾燥させることにより行う。

【0014】本発明の架橋ゼラチンゲル製剤の有効成分であるbFGFは、脳下垂体、脳、網膜、黄体、副腎、腎、胎盤、前立腺、胸腺などの臓器より抽出されるもの、組み換えDNA技術などの遺伝子工学的手法で製造されるもの、さらにこれらの修飾体であって繊維芽細胞増殖因子として作用し得るものを含む。bFGFの修飾体としては、例えば上記の抽出により得られたまたは遺伝子工学的手法で得られたbFGFのアミノ酸配列においてアミノ酸が付加されたもの、アミノ酸の一部が他のアミノ酸で置換されたもの、またはアミノ酸の一部が欠損したものなどが挙げられる。本発明においては、これらのbFGFまたはその修飾体は単独で用いてもよいし、これらの混合物として用いてもよい。

【0015】上記bFGFとしては、好ましくは、例えばWO87/01728 (特表昭63-500843号公報)、WO89/04832 (特表平2-504468号公報)、WO86/07595 (特表昭63-500036号公報)、WO87/03885 (特表昭63-501953号公報)、欧州特許出願公開第237966号明細書 (特表昭63-226287号公報)、欧州特許出願公開第281822号明細書 (特表平2-193号公報)、欧州特許出願公開第326907号明細書 (特表平2-209894号公報)、欧州特許出願公開第394951号明細書 (特表平3-61494号公報)、欧州特許出願公開第493737号明細書 (特表平5-124975号公報) などに記載のものが挙げられる。これらのbFGFのうち、WO87/01728に記載の遺伝子工学的手法製造した下記の配列番号1の154個のアミノ酸配列を有するポリペプチドおよび配列番号2の153個のアミノ酸配列を有するポリペプチドが、安定性および材料として必要な量を常時供給することが容易であるという点から特に好ましい。配列番号1のアミノ酸配列を有するbFGFは、具体的には特表昭63-500843号公報の実施例に記載されているように、ヒトの腎臓のmRNAから調製されたλgt10cDNAライブラリーからウシの1.4kb塩基性副断片を用いてヒトのbFGFのcDNAクローンを調製し、発現ベクターを構築して前記クローンを発現することによって得られる。

【0016】

【実施例】以下、実施例および試験例を挙げて本発明について詳細に説明するが、本発明は以下の実施例および試験例に限定されるものではない。

(実施例1) 1000ml容丸底フラスコにオリブ油375mlを加え、固定した攪拌用モーター (新東科学社

製、スリーワンモーター) にテフロン製攪拌用プロペラを取り付け、フラスコと一緒に固定した。オリブ油を30℃、420rpmにて攪拌しながら等電点4.9アルカリ処理ゼラチンとポリアニオンとしてカルボキシメチルセルロース(以下CMCと略称する、分子量24,000、カルボキシル基の置換度2.74)の混合水溶液(ゼラチン10%、CMC0、0.1、0.25、および0.5%)10mlを滴下し、W/O型エマルジョンを調製した。10分間攪拌後、フラスコを10~20℃に冷却し、30分攪拌した。冷却後、ここに100mlのアセトンを加え1時間攪拌した後、遠心分離によりCMCを包含したゼラチン粒子を回収した。回収した粒子をアセトンにて洗浄し、さらに2-プロパノール(以下IPAと略称する)にて洗浄することにより未架橋のCMCを包含したゼラチン粒子を得た。この粒子を乾燥させ、4℃で保存した。乾燥した未架橋ゼラチン粒子500mgを0.1%Tween 80を含むグルタルアルデヒド(以下GAという)水溶液(CMC0および0.1%はGA0.05%、5.0mMに相当、CMC0.25および0.5%はGA0.1%、10mMに相当)100mlに懸濁させ、4℃、15時間ゆるやかに攪拌することにより架橋反応を行った。反応終了後、架橋粒子を遠心分離により回収し、0.1%Tween 80を含む100mMグリシン水溶液にて37℃、1時間洗浄することにより架橋反応を停止した。反応停止後、架橋粒子を順に0.1%Tween 80水溶液、IPA、0.1%Tween 80水溶液で洗浄し、蒸留水で2回洗浄した後に凍結乾燥を行い、乾燥CMC付加架橋ゼラチン粒子(平均粒径40μm、含水率:CMC0、0.1、0.25、0.5%添加で、それぞれ90、87、87、90%)を得た。得られたCMCを付加した架橋ゼラチン粒子10mgに3.3mg bFGF/1ml 1/15Mリン酸緩衝液(pH6)の30μlを滴下し、4℃、一昼夜放置することによりbFGF水溶液を粒子内に含浸させ、bFGF含有CMC付加架橋ゼラチン粒子を調製した。得られたbFGF

F含有CMC付加架橋ゼラチン粒子を凍結乾燥させることにより、bFGF含有乾燥CMC付加架橋ゼラチン粒子を調製した。

【0017】(実施例2) CMC添加濃度を0.5%に固定し、架橋剤として1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(以下、WSCと略す)水溶液(0.1%、5mMに相当)を使用した以外は、実施例1と同様の方法でCMC付加架橋ゼラチン粒子(平均粒径40μm、含水率81%)、bFGF含有CMC付加架橋ゼラチン粒子、およびbFGF含有乾燥CMC付加架橋ゼラチン粒子を調製した。

【0018】(実施例3) ポリアニオンとしてポリグルタミン酸(以下PGAという)0.5%を使用し、GA濃度を0.05%(5mMに相当)に固定した以外は、実施例1と同様の方法でPGA付加架橋ゼラチン粒子(平均粒径40μm、含水率87%)、bFGF含有PGA付加架橋ゼラチン粒子、およびbFGF含有乾燥PGA付加架橋ゼラチン粒子を調製した。

【0019】(実施例4) ポリアニオンとしてデキストラン硫酸(以下DSという)0.5%を使用し、GA濃度を0.05%(5mMに相当)に固定した以外は、実施例1と同様の方法でDS付加架橋ゼラチン粒子(平均粒径40μm、含水率87%)、bFGF含有DS付加架橋ゼラチン粒子、およびbFGF含有乾燥DS付加架橋ゼラチン粒子を調製した。

【0020】上記実施例1~4で調製したbFGF含有ポリアニオン付加架橋ゼラチン粒子の処方および得られた架橋ゼラチン粒子の含水率を表1として示す。表1中、架橋剤GAおよびWSCはそれぞれグルタルアルデヒドおよび1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩を表す。また、表中のゼラチンおよび架橋剤の濃度%は、それぞれ「w/v%」を表し、含水率の%は「w/w%」を表す。

表1

【表1】

実施例 No.	ゼラチン	ポリアニオン 架橋剤	平均粒径 含水率	bPGF含有量
1	等電点4.9アルカリ 処理ゼラチン10%	なし GA 0.05%	40 μ m 90%	100 μ g /製剤
	等電点4.9アルカリ 処理ゼラチン10%	CMC 0.1% GA 0.05%	40 μ m 87%	〃
	等電点4.9アルカリ 処理ゼラチン10%	CMC 0.25% GA 0.1%	40 μ m 87%	〃
	等電点4.8アルカリ 処理ゼラチン10%	CMC 0.5% GA 0.1%	40 μ m 90%	〃
2	等電点4.9アルカリ 処理ゼラチン10%	CMC 0.5% WSC 0.1%	40 μ m 81%	〃
3	等電点4.9アルカリ 処理ゼラチン10%	PGA 0.5% GA 0.05%	40 μ m 87%	〃
4	等電点4.9アルカリ 処理ゼラチン10%	DS 0.5% GA 0.05%	40 μ m 87%	〃

【0021】（試験例1）実施例1および実施例3にて調製したbFGF含有ポリアニオン付加架橋ゼラチンゲル製剤をマウス背部皮下に注射により投与した。投与から3、7、および14日目における投与部位周辺での血管新生の程度をヘモグロビン量の変化を指標に評価した。なお、血管新生の評価は以下の様に行った。製剤投与部位の皮膚の裏側ならびに背部筋側組織を、製剤投与部位を中心に2cm四方をメスにて削り取った。これらの組織を0.75%の塩化アンモニウムを含有した17mMトリス塩酸緩衝液（pH7.6）中に浸漬しヘモグロビンを抽出した。ヘモグロビンはシアンメトヘモグロビン法（和光純薬社製、ヘモグロビンテストワコー）にて定量した。なお、マウスの匹数は1群5匹である。各群のヘモグロビン量の経時変化を図1に示す。100 μ gのbFGFを溶液状態で投与したり、bFGFを含まないポリアニオン付加架橋ゼラチンゲル粒子を投与しても、ヘモグロビン量は変化しない。ポリアニオンを含まないbFGF含有ゼラチンゲル製剤を投与した場合には、ヘモグロビン量は、3日目をピークに上昇し、以降減少していった。CMCを付加したbFGF含有架橋ゼラチンゲル製剤を投与した場合には、ヘモグロビン量

30 は、7日目をピークに上昇した。CMCの添加量の増加に伴い、7日目のヘモグロビン量も増加した。CMC含有量の最も多いCMC0.5%付加粒子においては14日目においてもヘモグロビンの残存が認められた。bFGF含有PGA付加架橋ゼラチンゲル製剤の場合にも、同夜のヘモグロビン量のパターンの変化が認められた。これは、添加したポリアニオンとbFGFが静電的相互作用をし、製剤からのbFGFの放出を抑制するために、組織での血管新生が遅延し、組織中のヘモグロビン量のパターンの変化となって現れたものと考えられる。

40 【0022】（試験例2）実施例4にて調製したbFGF含有DS付加架橋ゼラチンゲル粒子製剤をマウス背部皮下に注射により投与した。投与から3、7、および14日目における投与部位周辺での血管新生の程度をヘモグロビン量の変化を指標に評価した。血管新生の評価は、試験例1と同様の方法にて行った。ヘモグロビンの経時変化を図2に示す。DS付加粒子の場合にはヘモグロビン量のピークは3日目であり、ポリアニオンを添加しない粒子の場合と同様であった。しかしながら、ヘモグロビン量はその後もあまり減少せず、14日目においても相当量のヘモグロビンが認められた。これは、DS

11

12

を添加することによって、試験例1に示した場合と同様のbFGFの放出抑制が起こり、血管新生パターンが遅延したものと考えられる。

【0023】

【発明の効果】本発明によれば、架橋ゼラチンゲルにポリアニオンを少量付加することにより、bFGFの放出を抑制し、より長期にわたるbFGFの徐放化を達成することができた。本発明の製剤から徐放されたbFGFは生理活性を保持していた。さらに、添加するポリアニ*

*オンの種類や添加濃度を変えることにより、bFGFの活性発現の持続性を制御できた。

【0024】

【配列表】

【0025】配列番号：1

配列の長さ：154

配列の型：アミノ酸

起源

生物名：ホモ サピエンス (Homo sapiens)

配列

Ala	Ala	Gly	Ser	Ile	Thr	Thr	Leu	Pro	Ala	Leu	Pro	Glu	Asp	Gly	Gly
1				5			10			15					
Ser	Gly	Ala	Phe	Pro	Pro	Gly	His	Phe	Lys	Asp	Pro	Lys	Arg	Leu	Tyr
			20				25			30					
Cys	Lys	Asn	Gly	Gly	Phe	Phe	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Asp	Gly	Arg	Val
		35					40			45					
Asp	Gly	Val	Arg	Glu	Lys	Ser	Asp	Pro	His	Ile	Lys	Leu	Gln	Leu	Gln
		50					55			60					
Ala	Glu	Glu	Arg	Gly	Val	Val	Ser	Ile	Lys	Gly	Val	Cys	Ala	Asn	Arg
65							70			75					80
Tyr	Leu	Ala	Met	Lys	Glu	Asp	Gly	Arg	Leu	Leu	Ala	Ser	Lys	Cys	Val
				85					90					95	
Thr	Asp	Glu	Cys	Phe	Phe	Phe	Glu	Arg	Leu	Glu	Ser	Asn	Asn	Tyr	Asn
				100					105					110	
Thr	Tyr	Arg	Ser	Arg	Lys	Tyr	Thr	Ser	Trp	Tyr	Val	Ala	Leu	Lys	Arg
				115					120					125	
Thr	Gly	Gln	Tyr	Lys	Leu	Gly	Ser	Lys	Thr	Gly	Pro	Gly	Gln	Lys	Ala
				130					135					140	
Ile	Leu	Phe	Leu	Pro	Met	Ser	Ala	Lys	Ser						
145							150								

【0026】配列番号：2

配列の長さ：153

配列の型：アミノ酸

起源

生物名：ホモ サピエンス (Homo sapiens)

配列

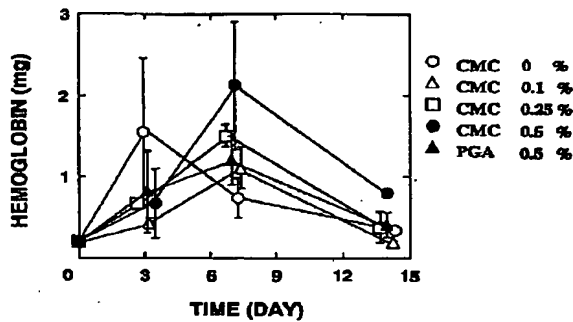
Ala	Gly	Ser	Ile	Thr	Thr	Leu	Pro	Ala	Leu	Pro	Glu	Asp	Gly	Gly	Ser
1				5					10				15		
Gly	Ala	Phe	Pro	Pro	Gly	His	Phe	Lys	Asp	Pro	Lys	Arg	Leu	Tyr	Cys
			20						25				30		
Lys	Asn	Gly	Gly	Phe	Phe	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Asp	Gly	Arg	Val	Asp
			35						40				45		
Gly	Val	Arg	Glu	Lys	Ser	Asp	Pro	His	Ile	Lys	Leu	Gln	Leu	Gln	Ala
			50						55				60		
Glu	Glu	Arg	Gly	Val	Val	Ser	Ile	Lys	Gly	Val	Cys	Ala	Asn	Arg	Tyr
65							70			75					80
Leu	Ala	Met	Lys	Glu	Asp	Gly	Arg	Leu	Leu	Ala	Ser	Lys	Cys	Val	Thr
				85					90					95	
Asp	Glu	Cys	Phe	Phe	Phe	Glu	Arg	Leu	Glu	Ser	Asn	Asn	Tyr	Asn	Thr
				100					105					110	
Tyr	Arg	Ser	Arg	Lys	Tyr	Thr	Ser	Trp	Tyr	Val	Ala	Leu	Lys	Arg	Thr
				115					120					125	

13
 Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys Ala Ile
 130 135 140
 Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala Lys Ser
 145 150

【図面の簡単な説明】

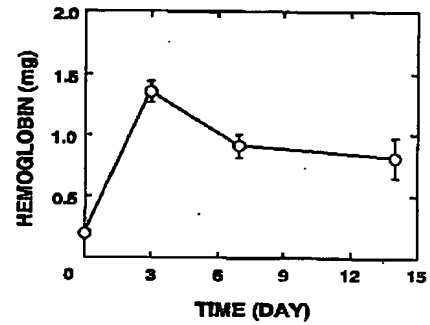
【図1】 図1は、ポリアニオン（カルボキシメチルセルロース、ポリグルタミン酸）付加架橋ゼラチンゲル製剤（bFGF 100 μ g）マウス皮下投与における周辺組織のヘモグロビン量の経時的変化を示す図である。

【図1】



【図2】 図2は、デキストラン硫酸付加架橋ゼラチンゲル製剤（bFGF 100 μ g）マウス皮下投与における周辺組織のヘモグロビン量の経時的変化を示す図である。

【図2】



This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**